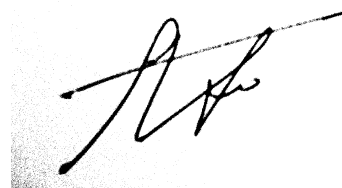


*На правах рукописи*



ГОРИН АНДРЕЙ ОЛЕГОВИЧ

**РОЛЬ БИОСИНТЕЗА СТЕРОЛОВ В  
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К  
БЛОКАТОРАМ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО  
ФАКТОРА РОСТА**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Абрамова Зинаида Ивановна**

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор  
**Мустафин Ильшат Ганиевич** (ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» заведующий кафедрой биохимии.

доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Коксин Владимир Петрович** (ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ» заведующий лабораторией биохимии.

**Ведущая организация** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет».

Защита диссертации состоится 20 июня 2013 г. в 13<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Казанский (Приволжский) федеральный университет, аудитория № 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 г.  
420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ к.104, отдел аттестации научных кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru

Ученый секретарь  
Диссертационного совета, доктор  
биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в XXI веке. Так как опухоль представляет собой совокупность бесконтрольно делящихся клеток, то для терапии опухолей самой предпочтительной мишенью является блокада сигнальных путей, ответственных за запуск митотических процессов. Одним из ключевых механизмов проведения таких сигнальных путей является рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР), стимулирующий деление клеток после активации факторами роста. Многие опухолевые клетки приобретают амплификацию или активирующие мутации этого рецептора, что дает им преимущество в делении и росте (Yarden Y. // *European journal of cancer*. 2001. №37(4). P.3). Это привело к созданию многочисленных блокаторов этого рецептора, которые показали хорошие результаты при исследованиях *in vitro* (Jimeno A. // *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005. №53. P.179). К таким блокаторам относятся антитела против внеклеточного домена рецептора и низкомолекулярные ингибиторы тирозиновых киназ. Однако в клинической практике блокада рецептора ЭФР оказалась значительно ниже предполагаемой вследствие развития опухолями первичной или приобретенной резистентности к используемым препаратам (Hopper-Borge E.A. // *Expert opinion on therapeutic targets*. 2009. №13. P.339). При большинстве опухолей эффективность такой терапии не превышает 10% (Metro G. // *Reviews on recent clinical trials*. 2006. №1. P.1)

Таким образом, поиск способов усиления эффективности блокаторов рецептора ЭФР является крайне актуальной проблемой современной онкологии, над которой работают многочисленные лаборатории в России и за рубежом. Большинство опубликованных по данной теме работ направлены на изменение структуры самого лекарственного средства для усиления его эффективности и уменьшения вероятности развития резистентности клетками опухолей (Elloumi J.//*Recent patents on biotechnology*.2012.№6.P.45).

В данной работе был использован новый подход к увеличению эффективности блокаторов рецептора ЭФР, основанный на принципе синтетической летальности. Во многих случаях причиной развития приобретенной резистентности является запуск альтернативных сигнальных путей (Janne P.A. // *Nature reviews Drug discovery*. 2009. №8. P.709), поэтому в качестве основы для работы было взято устранение этого обхода. Сигнальная система клеток представляет собой огромную сеть пересекающихся путей, которые до сих пор остаются не до конца изученными. Так как спрогнозировать путь обхода клеткой опухоли блокады рецептора на современном этапе развития науки не представляется возможным, то в качестве средства поиска альтернативных путей использовались опубликованные скрининговые исследования, указывающие точно на гены, блокада которых может усилить эффект ингибирования рецептора ЭФР (Astsaturov I. // *Science signaling*. 2010. №3. P.130).

Для сужения огромных баз данных были выбраны гены, относящиеся только к пути метаболизма стеролов. Блокада биосинтеза стеролов сама по себе была описана в качестве средства профилактики опухолей (Israel M. // *Mol Cancer*. 2011. №10. P.70). Кроме этого снижение уровня холестерина в мембранах клеток влияет на функционирование рецепторов факторов роста (Sigismund S. // *Developmental cell*. 2008. №15. P.209). Тем не менее, клинического применения лекарства, влияющие на биосинтез стеролов, не нашли. Более того дистальный участок пути стерольного синтеза в контексте онкологических заболеваний исследован не был. Нахождение генов из данного пути, блокада которых усиливает чувствительность опухолей к ингибиторам рецептора ЭФР, поможет существенно снизить смертность от опухолей, поддерживаемых функционированием рецептора ЭФР.

**Цель настоящей работы** заключалась в описании механизма влияния генов пути биосинтеза стеролов на сигнальный путь рецептора ЭФР.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Найти гены из пути биосинтеза стеролов, увеличивающие чувствительность опухолевых клеток к блокаторам рецептора ЭФР;
2. Провести биоинформатический анализ вовлечения найденных генов в общие клеточные процессы;
3. Исследовать механизм развития сенситизации к блокаде рецептора ЭФР при блокаде найденных генов;
4. Показать эффект блокады найденных генов на чувствительность к ингибированию рецептора ЭФР ксенографтных опухолей у мышей.

**Научная новизна.** В данной работе было впервые исследовано взаимодействие пути биосинтеза стеролов с сигнальным путем рецептора ЭФР. Показано, что эффект на жизнеспособность опухолевых клеток оказывает не сам факт блокады пути, а точечное ингибирование активности определенных генов, кодирующих этап С4-деметилирования предшественника холестерина. При этом было впервые описано, что эти гены контролируют такой общий клеточный процесс, как везикулярный транспорт, что не относится к их непосредственной функции. Это изменение движения везикул и является основной причиной развития опухолями сенситизации к лечению блокаторами рецептора ЭФР.

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные результаты представляют интерес для разработки новых лекарственных препаратов, которые будут усиливать эффект лечения пациентов антагонистами рецептора ЭФР, а также будут препятствовать развитию приобретенной резистентности опухолевыми клетками к данной терапии.

Кроме этого описанные взаимодействия являются крайне интересными для понимания процессов внутриклеточного везикулярного транспорта, так как описан абсолютно новый механизм модификации данного процесса посредством блокирования генов из пути биосинтеза стеролов. Таким образом, полученные данные представляют интерес как с практической точки зрения в качестве лекарственного препарата, так и с точки зрения таких теоретических дисциплин, как молекулярная биология и биохимия.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Ингибирование двух ферментов С4-деметилирующего комплекса из пути биосинтеза стеролов сенситизирует опухолевые клетки к блокаде рецептора ЭФР.
2. Блокада С4-деметиличивания приводит к изменению внутриклеточного движения везикул, что в результате ускоряет лизосомальную деградацию рецептора ЭФР.
3. Рост ксенографтных опухолей с выключенным ферментом из пути С4-деметиличивания подавляется практически полностью лечением блокаторами рецептора ЭФР.

**Апробация работы.** Результаты исследования докладывались на ежегодных конференциях «Актуальные проблемы биохимии и нанотехнологии» (Казань, 2012 и 2013), на III Международной научно-практической конференции «Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли» (Казань, 2012; приз за лучший устный доклад), на 50-й ежегодной конференции Американского общества клеточной биологии (Филадельфия, США, 2010), на 13-й конференции онкологического института Фокс Чейз (Филадельфия, США, 2011; второе место в постерной сессии), на конференции «Метаболизм и опухоль» Американской ассоциации исследования опухоли (Балтимор,

США, 2011), на конференции «Молекулярные мишени и терапия опухоли» Американской ассоциации исследования опухоли (Сан-Франциско, США, 2011), на I конференции университета Тэмпл (Филадельфия, США, 2012).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди которых 1 публикация в рецензируемом журнале, включенном в список ВАК и 2 публикации в журналах базы SCOPUS.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, включает 31 рисунок. Библиография включает 141 наименование.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материалы и методы исследования.** В экспериментах *in vitro* использовались клеточные линии эпидермоидной карциномы A431, сквамозных карцином SCC61, SCC68 и FaDu, немелкоклеточного рака легкого PC9. Для выключения ферментов стерольного синтеза использовалась трансфекция при помощи миРНК. Для блокады рецептора ЭФР применялись ингибитор эрлотиниб (Santa Cruz, США) и антитело цетуксимаб (FCCC, США), для стимуляции – ЭФР (Sigma-Aldrich, США). Для исследований *in vivo* использовались самцы мышей весом 25г линии C-B17.SCID (Jackson Laboratory, США).

**Трансфекция клеток при помощи миРНК.** Для проведения трансфекции использовались клетки в концентрации 250 тысяч для A431 или 170 тысяч для остальных линий на лунку 6-луночного планшета в среде DMEM, содержащей 1% сыворотки теленка и L-глутамин. Для

одной лунки 6-луночного планшета 1,8 мкл миРНК (20 мкМ) смешивались с 6 мкл трансфекционного реагента HiPerfect в 96 мкл безсывороточной среды DMEM. Через 30 минут инкубации при комнатной температуре раствор с образовавшимися комплексами миРНК-HiPerfect добавлялся в 1 мл 1%-ной среды DMEM с клетками до конечной концентрации миРНК 10 нМ. Через 72 часа после трансфекции происходил полный нокдаун гена и клетки были готовы для проведения экспериментов. В экспериментах с использованием блокаторов через 48 часов начала после трансфекции к клеткам добавлялись лекарственные вещества. Также через двое суток среда клеток сменялась на бессывороточную DMEM для уменьшения процессов везикулярного транспорта и концентрации рецептора ЭФР на поверхности клеток.

**Анализ экспрессии белка методом иммуноблотинга.** Клетки сажались в концентрации 250 тысяч для A431 или 170 тысяч для остальных линий на лунку 6-луночного планшета в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки телячьей и L-глутамин. Через 24 часа инкубации клетки стимулировались 100 нг/мл ЭФР в бессывороточной среде. По окончании стимуляции клетки помещались на лед для остановки всех внутриклеточных процессов, отмывались два раза в натрий-фосфатном буфере и лизировались в 50 мкл буфера RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз на лунку 6-луночного планшета. Клетки соскабливались клеточным скребком и полученные лизаты помещались в пробирки. Далее лизаты центрифугировались на скорости 13,000 g в течение 30 минут для осаждения нерастворенных частиц. В полученных супернатантах измерялся уровень белка по методу Лоури, после чего концентрации белка уравнивались путем добавления лизирующего буфера в более концентрированные образцы до концентрации наиболее разбавленного. После этого лизаты кипятились в



растворе 2%-ного додецилсульфата натрия в течение пяти минут для полной денатурации белков. Полученные образцы разгонялись методом электрофореза при 120В на градиентном (4-12%) полиакриламидном геле. Белки с геля переносились на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану с помощью электроблоттинга при напряжении 30 В в течение 4-10 часов. Мембрана блокировалась в течение часа в блокирующем буфере Odyssey, после чего инкубировалась с первичными антителами в конечной концентрации 100 нг/мл в течение 12-24 часов при +4°C. Затем мембрана отмывалась три раза по пять минут в трис-боратном буфере, содержащем 0.05% Твин-20, и в течение часа при комнатной температуре инкубировалась с вторичными антителами, меченными флуоресцентной меткой, в конечной концентрации 1 мкг/мл. После трех отмывок мембрана сканировалась на сканнере Licor Odyssey Scanner.

**Анализ выживаемости клеток.** Для анализа выживаемости клетки сажались в 96-луночные планшеты в концентрации 3 тысячи клеток на лунку. миРНК трансфекция проводилась описанным выше способом. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавлялось 10 мкл среды, содержащей 10-кратное количество лекарственных веществ. После этого клетки инкубировались в течение трех дней. Через 96 часов после трансфекции к клеткам добавлось 10 мкл на лунку реагента CellTiter Blue. Живые клетки метаболизируют входящий в состав реагента ресазурин, восстанавливая его до флуоресцентного ресорифина. Через два часа после добавления реагента флуоресценция клеток считывалась при помощи спектрофотометра на длине волны 573 нм. Интенсивность сигнала была прямо пропорциональна количеству жизнеспособных клеток в лунке.

**Анализ апоптоза.** Анализ клеточной гибели проводился по методу мечення апоптотических клеток красителем аннексином V. Через 48 часов после трансфекции к клеткам SCC61 в 6-луночном планшете добавлялся

эрлотиниб в рабочей концентрации. Через 72 часа клетки трипсинизировались, ресуспендировались и окрашивались аннексином V, меченным зеленой меткой, и 7-амино-актиномицином, меченным красной меткой. Результаты считывались при помощи проточного цитометра.

**Иммунопреципитация и анализ убиквитинилирования рецептора ЭФР.** Через 72 часа после трансфекции клетки лизировались в буфере RIPA. Очищенные центрифугированием и нормализованные на уровень белка лизаты растворялись в 0.5 мл натрий-фосфатного буфера и инкубировались с 10 мкл антител к рецептору ЭФР в течение 12 часов при +4°C при постоянном вращении. Затем к лизатам добавлялось 20 мкл протеин-G-конъюгированных агарозных бус и инкубировались в течение 2 часов при +4°C при постоянном вращении. Бусы осаждались центрифугированием при 3,000 g и отмывались в натрий-фосфатном буфере три раза, после чего кипятились в растворе додецилсульфата натрия в течение пяти минут для отщепления белков от бус и их денатурации. Суспензия бус центрифугировалась при 10,000 g и полученный супернатант подвергался анализу иммуноблоттингом по описанному выше протоколу. После переноса белков мембрана окрашивалась антителами к убиквитину и рецептору ЭФР в качестве контроля преципитации.

**Иммунофлуоресценция и анализ колокализации сигналов.** Клетки выращивались и трансфецировались в 6-луночных планшетах на стеклянных покровных стеклах. Через 48 часов после трансфекции среда клеток сменялась на бессывороточную для уменьшения процессов везикулярного транспорта и концентрации рецептора ЭФР на поверхности клеток. Через 72 часа после трансфекции клетки помещались на лед и инкубировались с меченным зеленой меткой ЭФР в концентрации 200 нг/мл в течение 10 минут, после чего отмывались от несвязавшегося

лиганда в холодном натрий-фосфатном буфере, помещались в полную ростовую среду и инкубировались при +37°C для стимуляции рецептора. По окончании стимуляции клетки немедленно помещались на лед для остановки транспорта рецептора и отмывались холодным натрий-фосфатным буфером. Клетки фиксировались в натрий-фосфатном буфере, содержащем 4% формальдегида, в течение 10 минут при комнатной температуре. Все последующие процедуры выполнялись при комнатной температуре. Перфорация клеточных мембран проводилась раствором 0.05%-ного тритона X-100 в натрий-фосфатном буфере в течение 5 минут, после чего клетки блокировались в растворе 3%-ного бычьего сывороточного альбумина в натрий-фосфатном буфере в течение 30 минут. Затем клетки окрашивались по 1 часу первичными и вторичными антителами с тремя пятиминутными отмывками натрий-фосфатным буфером после каждой инкубации. Концентрация первичных антител составляла 1-2 мг/мл, вторичных антител – 2 мкг/мл. Покровные стекла приклеивались на предметные при помощи глицерола, содержащего краситель ДНК DAPI. Фотографии с полученных слайдов снимались на спектральном конфокальном микроскопе Nikon C-1 объективом с 60-кратным увеличением. Полученные снимки анализировались в программном обеспечении MetaMorph (Universal Imaging/Molecular Devices). Анализ колоколизации красного и зеленого сигналов проводился при помощи встроенного в программу приложения.

**Проточная цитометрия.** Клетки трипсинизировались и после подсчета разводились до конечной концентрации  $10^6$  клеток/мл в холодном натрий-фосфатном буфере, содержащем 10% сыворотки и 1% азида натрия. Все процедуры проводились на льду для замедления внутриклеточного транспорта рецептора ЭФР. В пробирки помещалось по 100 мкл суспензии клеток и добавлялись первичные антитела до конечной

концентрации 1 мкл/мл, после чего клетки инкубировались в течение часа. Клетки отмывались от неприсоединенных антител 3 раза в натрий-фосфатным буфере с центрифугированиями со скоростью 900 g для осаждения клеток. Затем клетки инкубировались со вторичными антителами в конечной концентрации 2 мкг/мл в течение часа, после чего отмывались 3 раза в натрий-фосфатным буфере. Готовые образцы хранились при +4°C без доступа света до считывания результатов при помощи проточного цитометра.

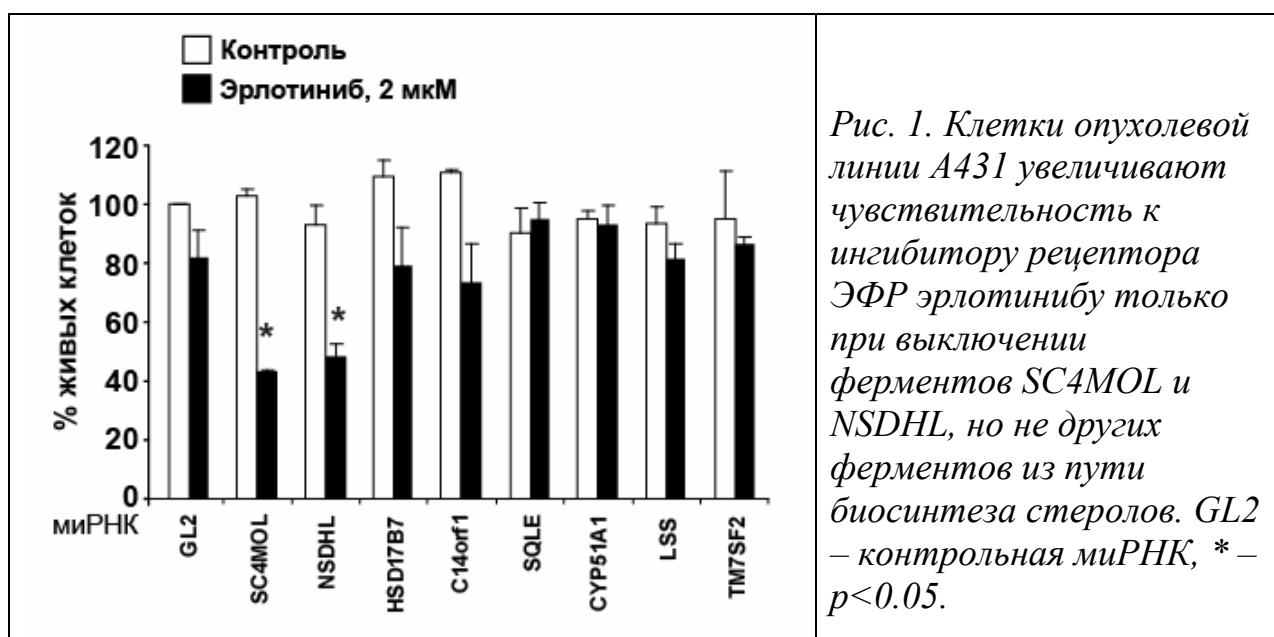
**Статистический анализ.** Для статистического анализа полученных данных использовался двусторонний t-критерий Стьюдента. Статистически достоверным принималось различие при значении  $p < 0.05$ . Проверка полученных выборок на нормальность распределения проводилась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова; критерием нормальности выборки было значение  $p > 0.10$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### ***Увеличение чувствительности опухолевых клеточных линий к блокаде рецептора ЭФР***

Для определения генов, сенситизирующих опухолевые клетки к блокаде рецептора ЭФР, был проскринирован весь дистальный участок пути биосинтеза стеролов. Как показано на рис. 1, выключение синтеза только ферментов SC4MOL и NSDHL значительно увеличивает гибель клеток A431 при лечении их ингибитором рецептора ЭФР эрлотинибом.

Аналогичные результаты были получены и на других опухолевых клеточных линиях: SCC61, SCC68, FaDu, PC9. Клетки нормального эпителия молочной железы оказались нечувствительными к блокаде, что говорит о специфическом эффекте на клетки, рост которых в значительной мере опосредуется функционированием рецептора ЭФР.



Анализ клеточной гибели показал, что клетки гибнут механизмом апоптоза (рис. 2).

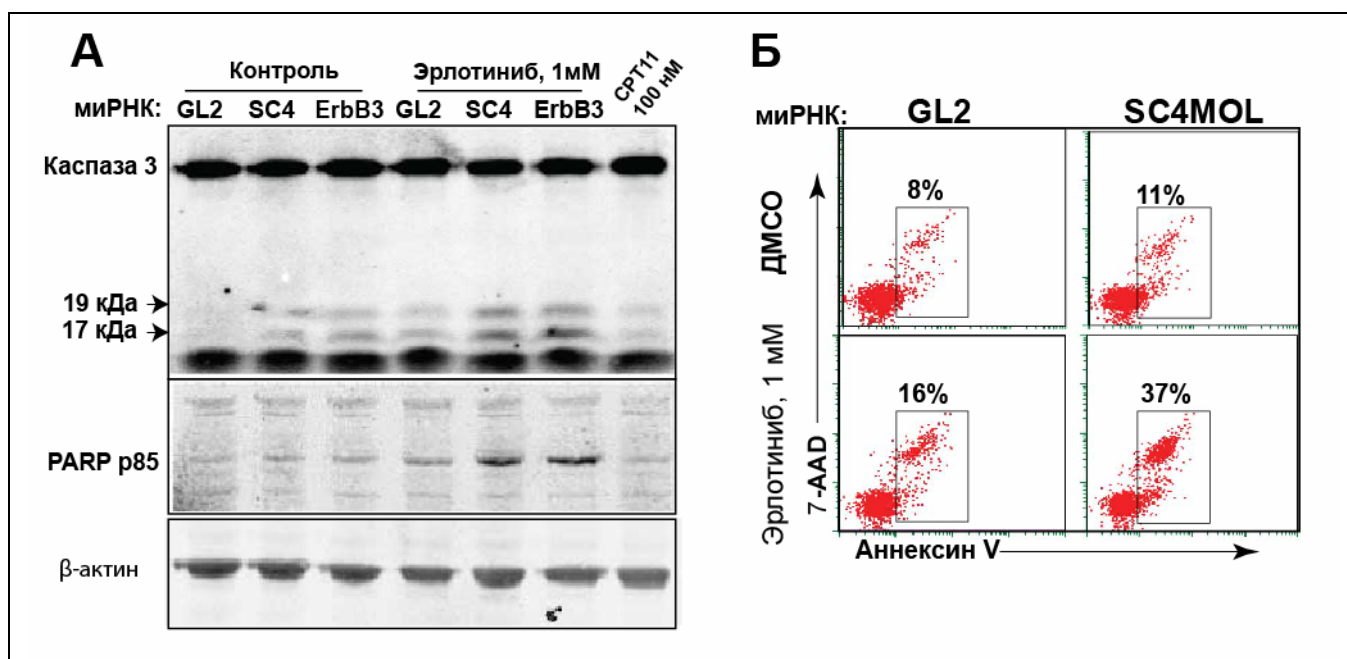


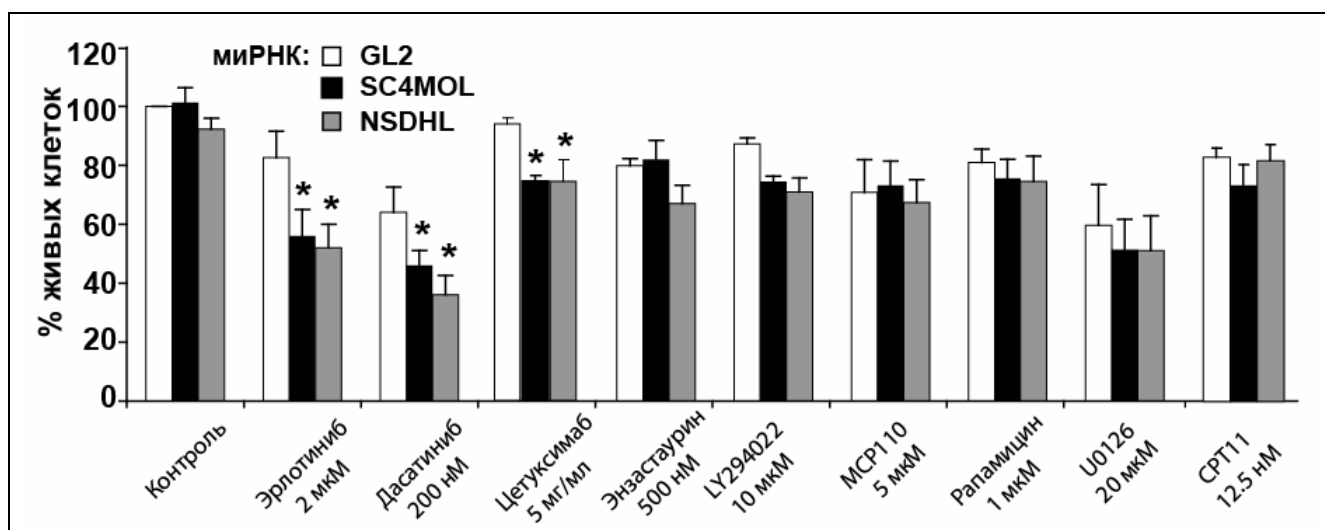
Рис. 2. Удаление метиоксидазы SC4MOL с одновременной блокадой рецептора ЭФР эрлотинибом вызывает апоптотическую гибель клеток опухолевой линии A431. Маркеры апоптоза: расщепление каспазы 3 и индукция белка PARP, измеренные методом иммуноблоттинга (А) и увеличение количества аннексин V-положительных клеток, измеренное методом проточной цитофлуориметрии (Б).

Выключение других ферментов не оказало влияния на чувствительность к лекарству. Ферменты SC4MOL и NSDHL катализируют одну комплексную реакцию отщепления метильной группы

от 4 атома углерода предшественника холестерина. Это позволяет предположить, что решающим фактором сенситизации клеток к блокаде рецептора ЭФР является не само выключение генов, а остановка синтеза стеролов на определенном этапе – С4-деметиловании стеролов.

### ***Специфичность эффекта к антагонистам рецептора ЭФР***

На клеточной культуре A431 было установлено, что выключение SC4MOL и NSDHL увеличивает чувствительность клеток только к лекарственным веществам, блокирующим функционирование рецептора ЭФР (рис. 3).



*Рис. 3. Удаление ферментов SC4MOL и NSDHL в клетках опухолевой линии A431 приводит к увеличению их чувствительности только по отношению к антагонистам рецептора ЭФР: эрлотинибу, дасатинибу и цетуксимабу, но не блокаторам других рецепторов или сигнальных путей. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с контрольными клетками.*

Остановка стерольного пути на этапе С4-деметилования увеличило чувствительность клеток к следующим веществам: низкомолекулярному ингибитору рецептора ЭФР эрлотинибу, неспецифическому ингибитору рецептора дасатинибу и антителу против рецептора цетуксимабу. При этом ответ на лечение блокаторами других рецепторов и сигнальных путей остался неизменным. Это указывает на специфичность эффекта

как в отношении места блокады стерольного пути, так и в отношении мишени, к которой возникает сенситизация.

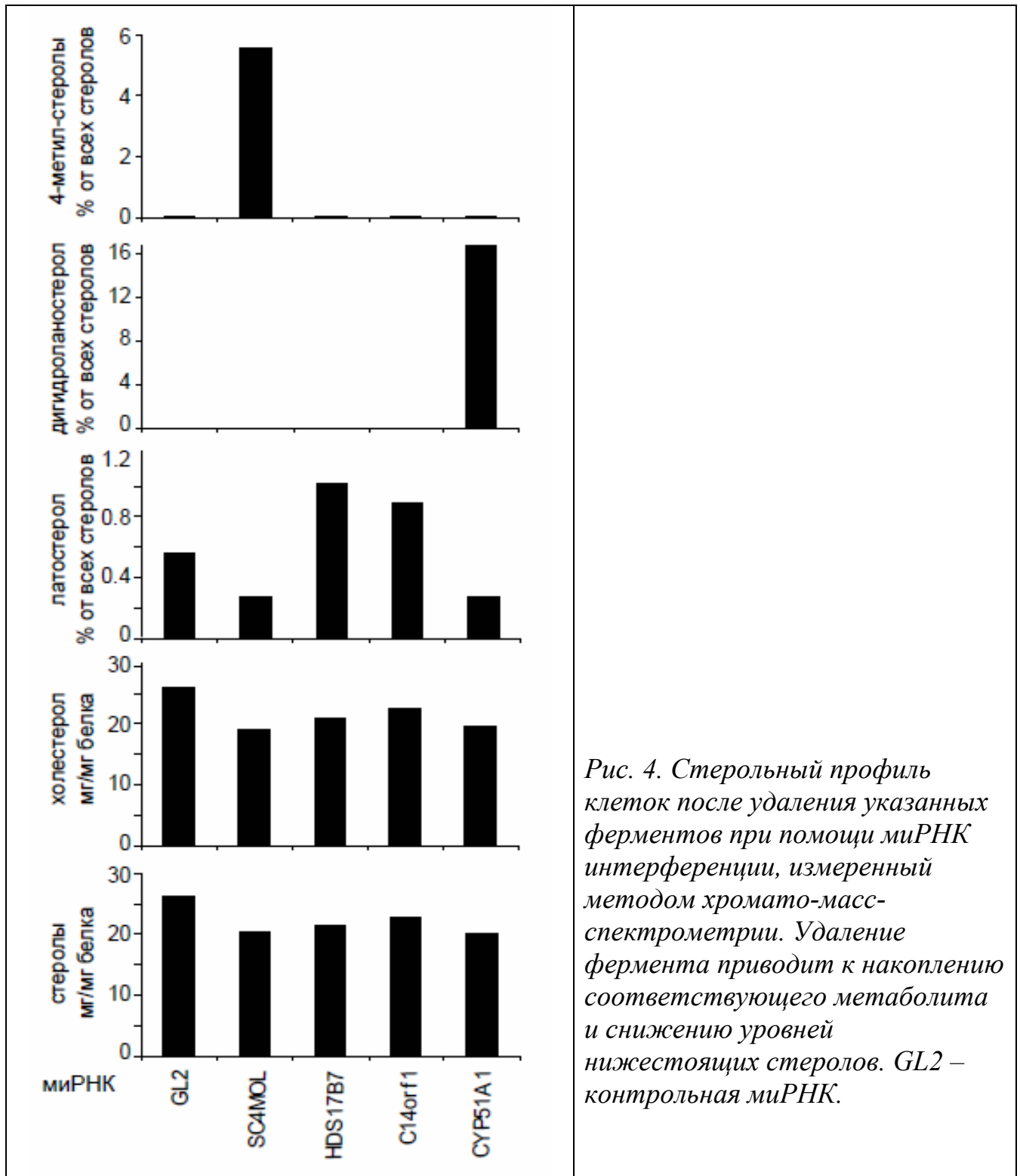
### ***Изменение стерольного профиля клеток при блокаде стерольного пути на различных участках***

На рис. 4 представлены данные по изменению стерольного состава клеток A431, измеренному методом хромато-масс-спектрометрии, после блокады пути биосинтеза стеролов на разных его этапах: три фермента, участвующих в С4-деметиловании (SC4MOL, HSD17B7, C14Orf1) и CYP51A1 – фермент, катализирующий реакцию на два шага выше С4-деметилования.

Так как путь биосинтеза стеролов является полностью необратимым, то при выключении указанных ферментов в клетках накапливались специфические для данного этапа пути метаболиты и снижалось содержание нижестоящих метаболитов, в том числе и самого холестерина. В частности, удаление SC4MOL приводило к существенному накоплению метилированных стеролов, в норме отсутствующих в клетках. Полученные данные позволили предположить, что изменение стерольного состава является ключевым фактором, влияющим на изменение чувствительности опухолевых клеток к антагонистам рецептора ЭФР.

### ***Добавление нижестоящих метаболитов***

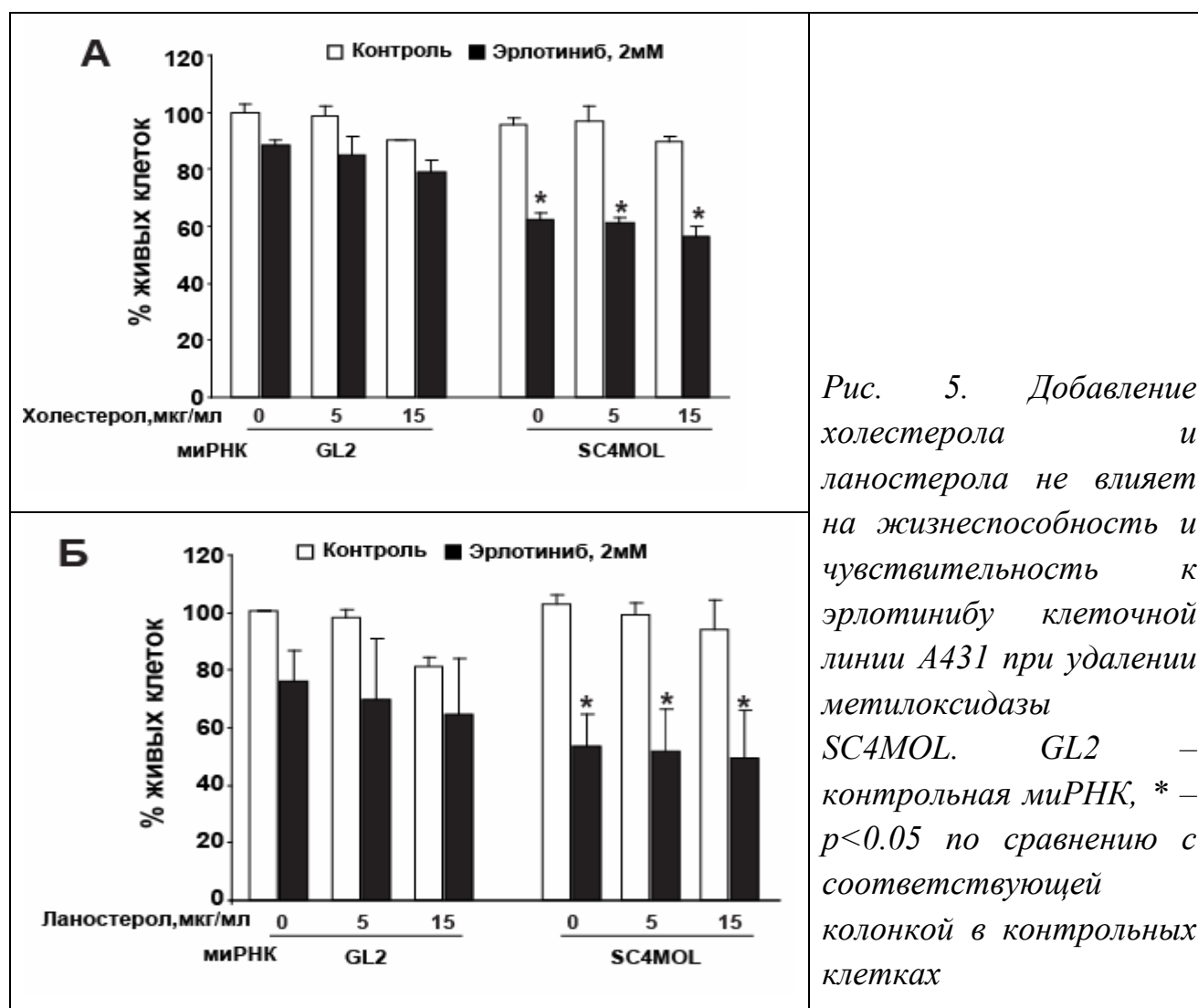
Так как при выключении SC4MOL и NSDHL падал общий уровень холестерина, то для начала было решено проверить, уменьшатся ли наблюдаемые эффекты при добавлении нижестоящих метаболитов: ланостерола и холестерина. На рис. 5 показано влияние добавления указанных стеролов на жизнеспособность клеток A431 и их сенситизацию к ингибитору рецептора ЭФР эрлотинибу



### ***Исследование механизма сенситизации***

Описанные выше данные позволяют связать развитие сенситизации с изменением состава стеролов в мембранах клеток. Для определения ключевого фактора в развитии сенситизации был проведен ряд экспериментов по модификации стерольного состава клеток.





Добавление ланостерола и холестерина не оказало значительного влияния на жизнеспособность и сенситизацию клеток. Таким образом, снижение уровня нижестоящих стеролов не является причиной появления описываемых эффектов.

### *Добавление метилированных стеролов*

Далее была проверено, воспроизведутся ли эффекты удаления SC4MOL и NSDHL при добавлении к клеткам метилированных по 4 атому углерода стеролов. Для этого были взяты непосредственный субстрат реакции C4-деметилования T-MAS и FF-MAS, отличающий ненасыщенной связью при 14 атоме. Результат добавления T-MAS к различным опухолевым линиям показан на рис. 6.

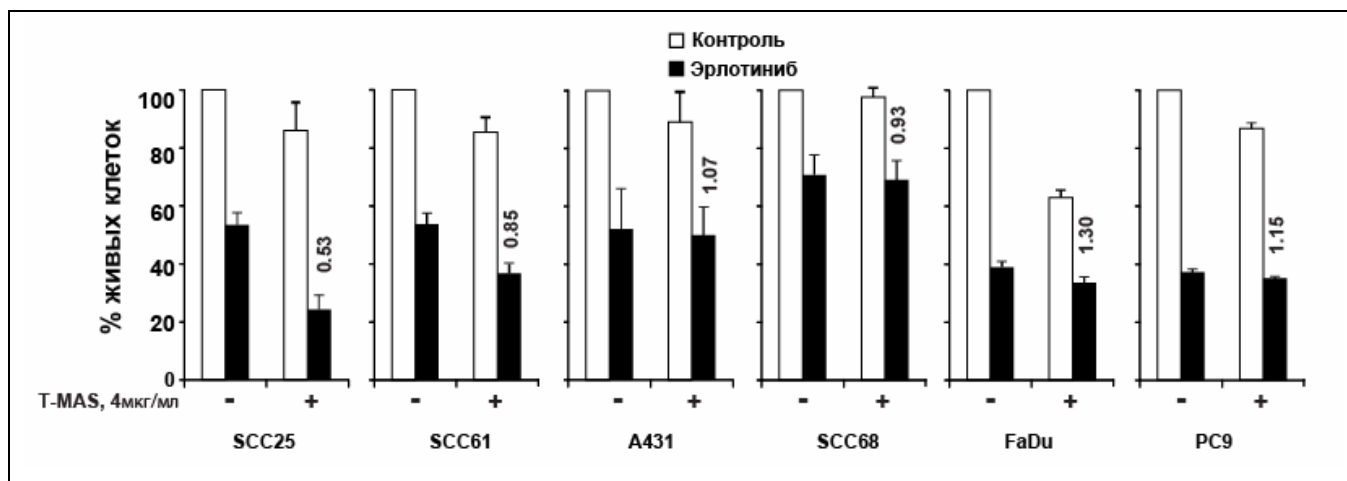


Рис. 6. Эффект добавления T-MAS на жизнеспособность и чувствительность опухолевых клеточных линий к блокаде рецептора ЭФР эрлотинибом (1 мМ). Над колонками указан индекс сенситизации для данной клеточной линии. Значительное увеличение чувствительности наблюдалось только на клеточной линии SCC25, но не на других линиях.

Для двух из шести клеточных линий (SCC25 и SCC61) T-MAS показал значительную сенситизацию к эрлотинибу. Тем не менее, для большинства линий метаболит не оказал существенного влияния.

FF-MAS оказался токсичным для клеток (рис. 7). В результате высокой токсичности оказалось невозможным оценить сенситизирующий эффект при добавлении FF-MAS. Тем не менее, сам факт токсичности метаболита оказался крайне интересным, так как до настоящего времени FF-MAS был описан только в качестве индуктора процессов мейоза.

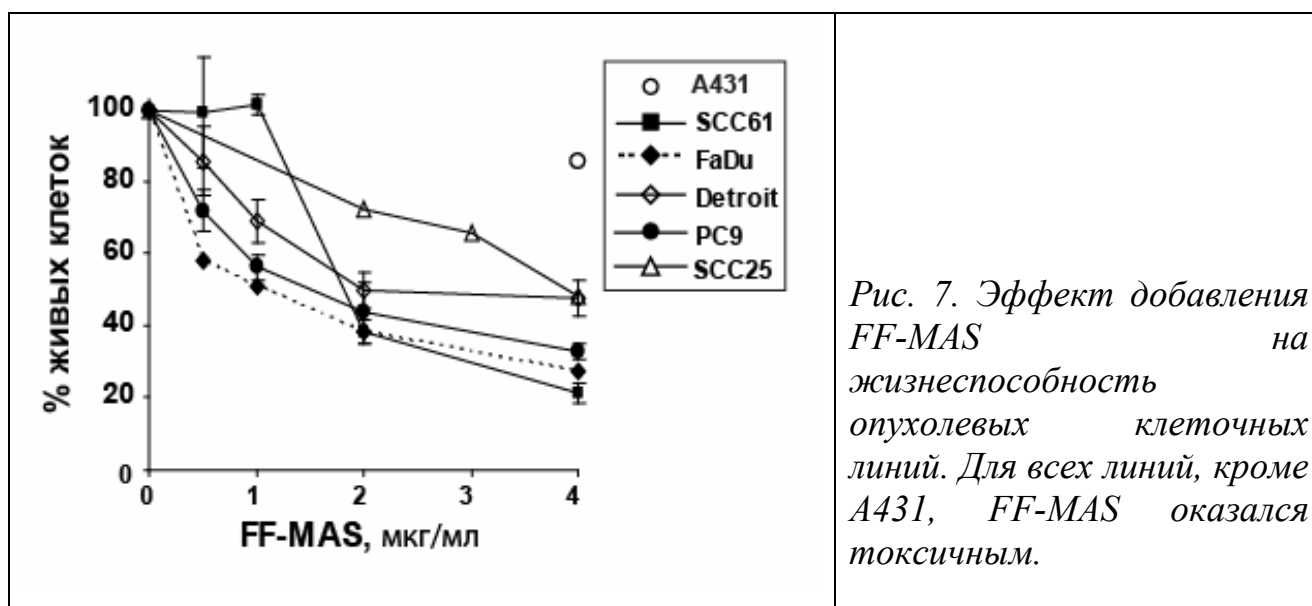


Рис. 7. Эффект добавления FF-MAS на жизнеспособность опухолевых клеточных линий. Для всех линий, кроме A431, FF-MAS оказался токсичным.

Эффекты T-MAS и FF-MAS оказались сильнее выражены в клеточных линиях с наименьшей экспрессией рецептора ЭФР. Клетки A431, несущие амплификацию гена рецептора, оказались практически нечувствительны к добавлению метаболитов. Это указывает на опосредованность эффекта функционированием рецептора ЭФР. Тем не менее, в целом непосредственное добавление метаболитов не воспроизводит полностью эффекта блокады стерольного пути, что может быть объяснено различной концентрацией стеролов внутри клетки и различием в их локализации при экзогенном добавлении и внутреннем накоплении при блокаде синтеза.

***Карта взаимодействий ортолога гена SC4MOL в дрожжах  
Saccharomyces cerevisiae***

В связи с малым количеством информации о функции и взаимодействиях гена *SC4MOL* в человеке и в связи с тем, что путь биосинтеза стеролов является высоко консервативным среди всех эукариот, для понятия механизма влияния на рецептор ЭФР был проведен анализ взаимодействий эволюционно консервативного гомолога (ортолога) гена *SC4MOL* в дрожжах – *ERG25*. Результат этого анализа представлен на рис. 8.

Помимо основной функции в процессах синтеза и метаболизма *ERG25* активно вовлечен в процессы внутриклеточного везикулярного транспорта. Это дает основания предположить схожие функции гена *SC4MOL* в клетках человека. Таким образом, нарушение функции гена может приводить к изменению движения везикул, содержащих рецептор ЭФР, и этим может опосредоваться эффект удаления метилоксидазы на функционирование рецептора.

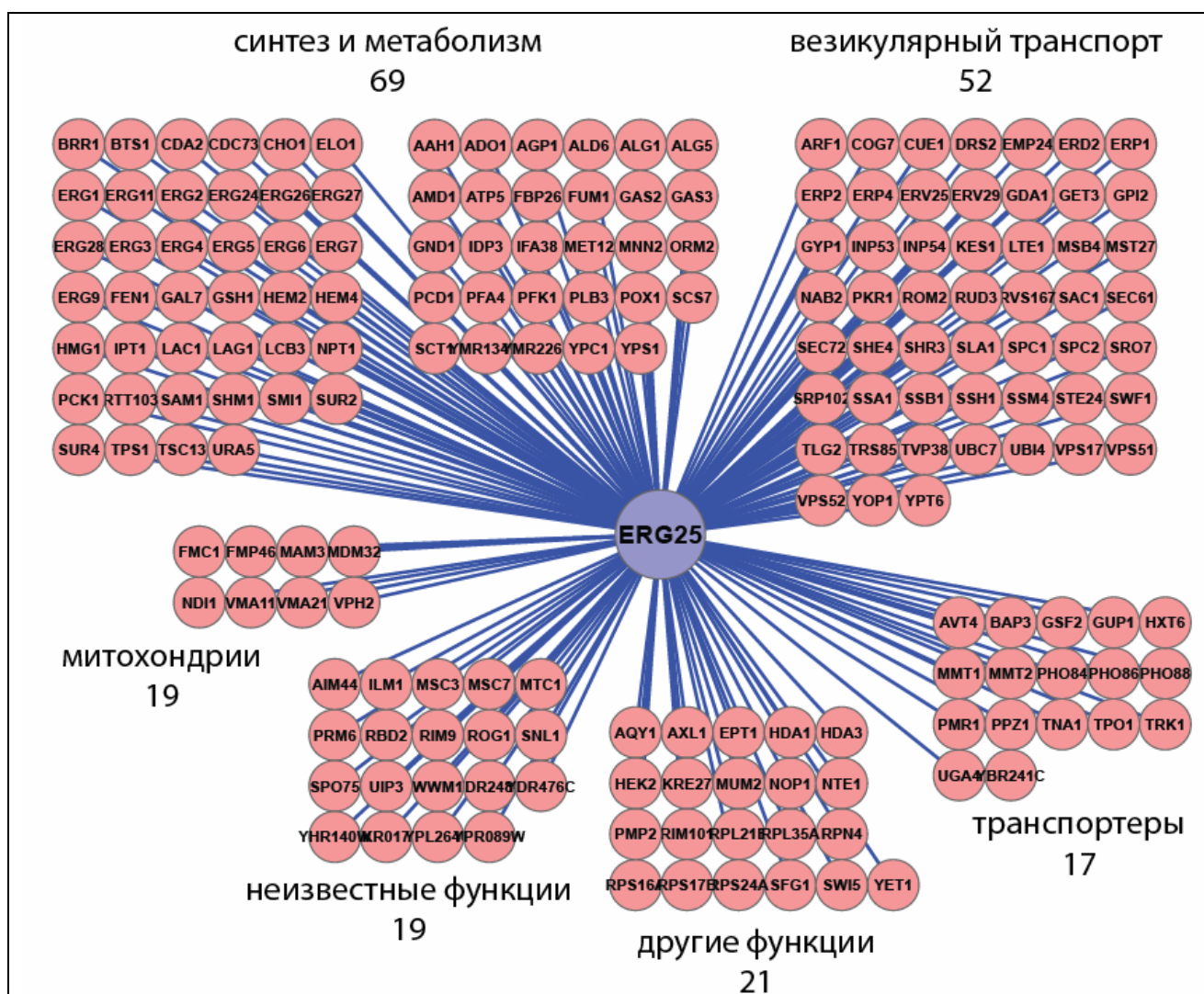
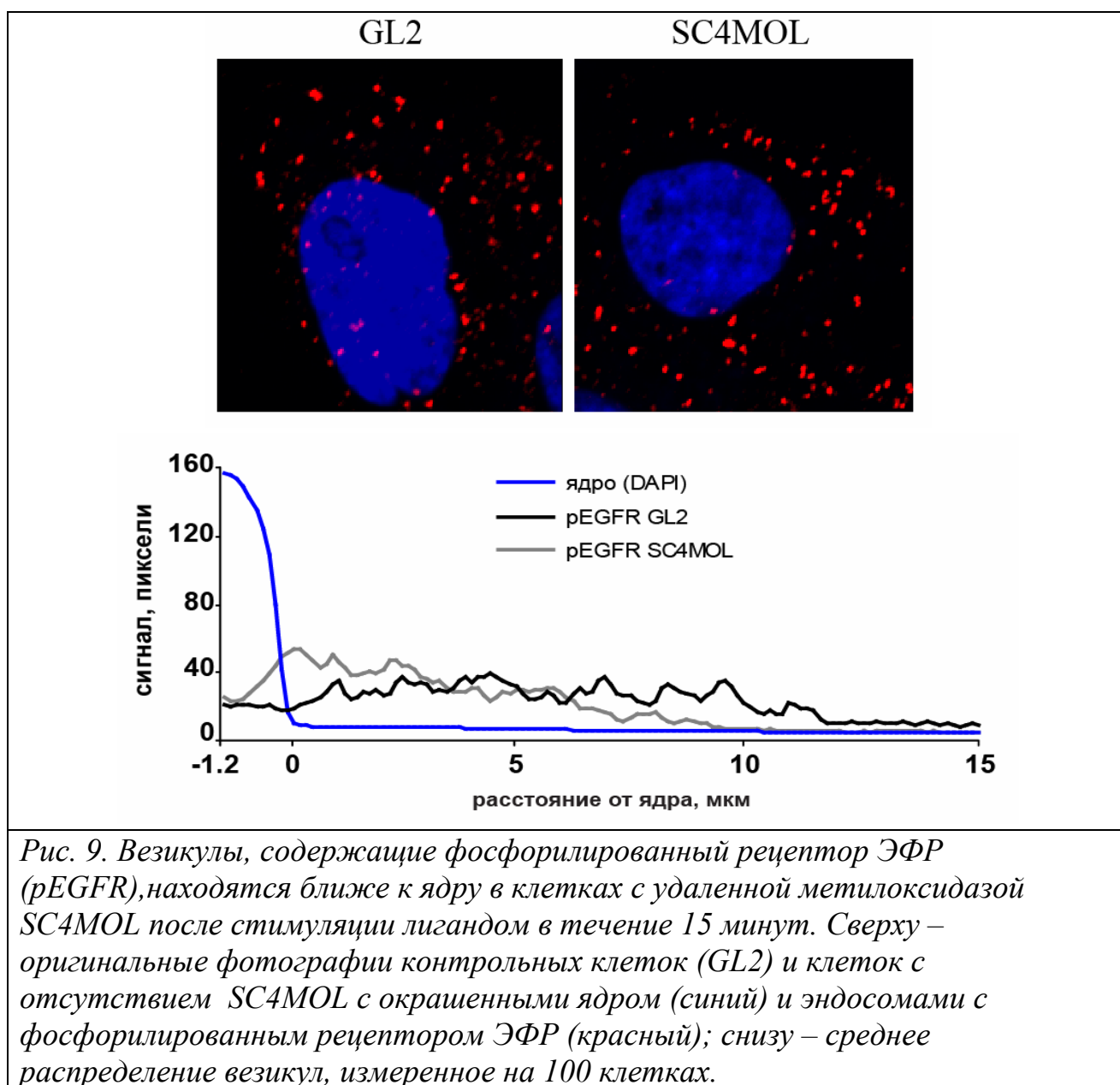


Рис. 8. Карта генетических и физических взаимодействий гена *ERG25* (ортолога *SC4MOL*) в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* согласно базе данных BioGrid. Взаимодействующие гены поделены по выполняемым функциям. Цифрами указано количество генов в группе. 28% всех взаимодействий гена приходится на везикулярный транспорт.

### **Влияние удаления *SC4MOL* на внутриклеточный транспорт рецептора ЭФР**

#### **Общее распределение эндосом с рецептором ЭФР**

В нормальных условиях после активации рецептор ЭФР фосфорилируется и подвергается интернализации, попадая сначала в ранние эндосомы. Затем одна часть рецептора переходит в рециклирующие эндосомы и возвращается на поверхность клетки, а другая часть попадает в поздние эндосомы для последующей деградации в лизосомах.



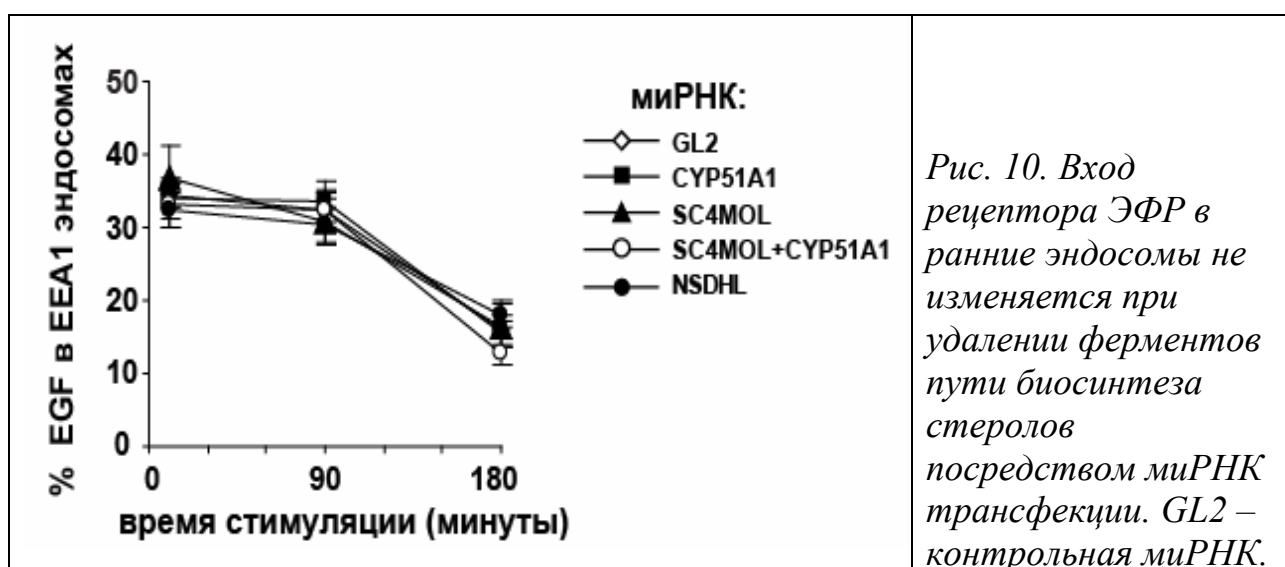
Иммунофлуоресцентная окраска эндосом, содержащих рецептор ЭФР, показала различие в распределении рецептора после его активации лигандом в клетках с выключенным SC4MOL по сравнению с контрольными клетками (рис. 9). Везикулы с рецептором ЭФР находятся значительно ближе к ядру в клетках с выключенным ферментом. Эти данные подтверждают гипотезу о влиянии гена SC4MOL на движение и локализацию эндосом.

Для подробной характеристики изменения везикулярного транспорта была проведена серия экспериментов по измерению вхождения рецептора

в ранние, рециклирующие и поздние эндосомы. Для этого производилась иммунофлуоресцентная окраска рецептора ЭФР и исследуемых эндосом, после чего измерялся процент колокализации этих двух сигналов.

### ***Вхождение рецептора ЭФР в ранние эндосомы***

Для визуализации ранних эндосом использовался специфический маркер EEA1. После активации рецептора ЭФР лигандом измерялось его вхождение в ранние эндосомы в клетках с выключением различных ферментов (рис. 10).



Как видно из графика, блокада пути биосинтеза стеролов на различных этапах не влияет на вход рецептора ЭФР в ранние эндосомы.

### ***Вхождение рецептора ЭФР в рециклирующие эндосомы***

В качестве маркера рециклирующих эндосом использовался белок Rab11. Как видно из рис. 11, клетки с удаленным SC4MOL или NSDHL имеют значительно меньшую часть рецептора ЭФР в рециклирующих эндосомах. Это свидетельствует о том, что при выключении этих ферментов количество рецептора, возвращающего на поверхность клетки сразу после интернализации, уменьшается.



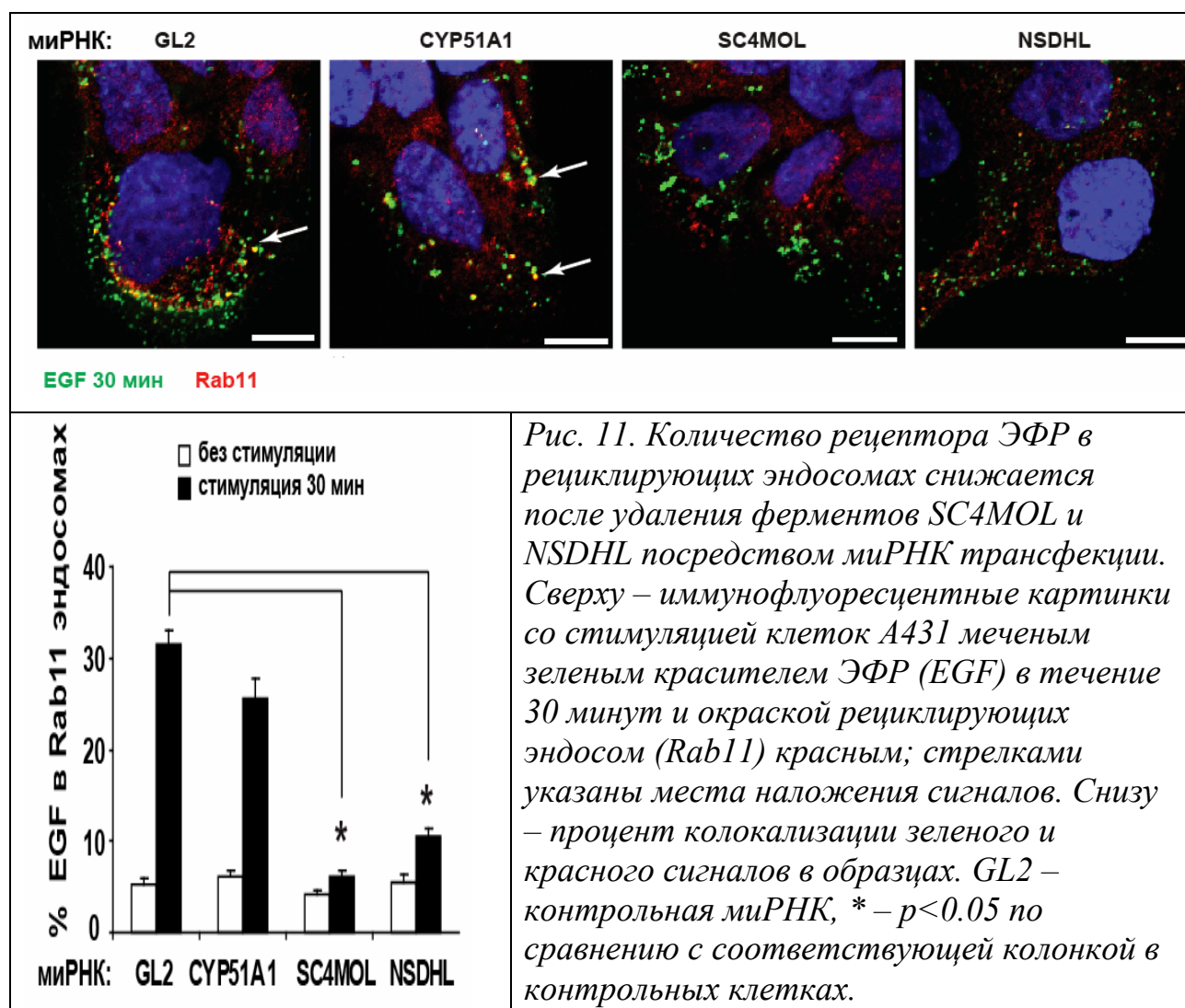


Рис. 11. Количество рецептора ЭФР в рециклирующих эндосомах снижается после удаления ферментов SC4MOL и NSDHL посредством миРНК трансфекции. Сверху – иммунофлуоресцентные картинки со стимуляцией клеток A431 меченым зеленым красителем ЭФР (EGF) в течение 30 минут и окраской рециклирующих эндосом (Rab11) красным; стрелками указаны места наложения сигналов. Снизу – процент колокализации зеленого и красного сигналов в образцах. GL2 – контрольная миРНК, \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующей колонкой в контрольных клетках.

### Вхождение рецептора ЭФР в поздние эндосомы

Маркером поздних эндосом служил Rab7. Анализ колокализации рецептора с поздними эндосомами показал обратную ситуацию. В случае ингибирования SC4MOL и NSDHL в поздних эндосомах после стимуляции лигандом в течение 30 минут содержалось большее количество рецептора, чем в контрольных клетках (рис. 12).

Все описанные данные показывают, что блокада С4-деметилирующих ферментов изменяет движение рецептора ЭФР из пути рециклирования в сторону поздних эндосом. Поздние эндосомы переходят с лизосомы, в которых происходят процессы деградации белков, что в нашем случае свидетельствует об увеличении деградации рецептора

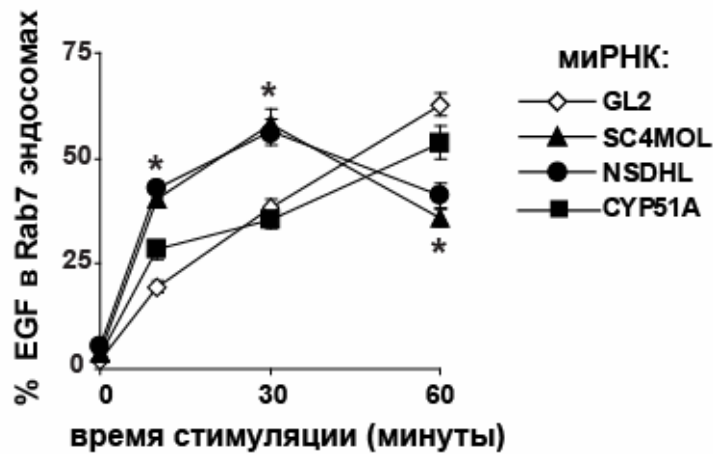
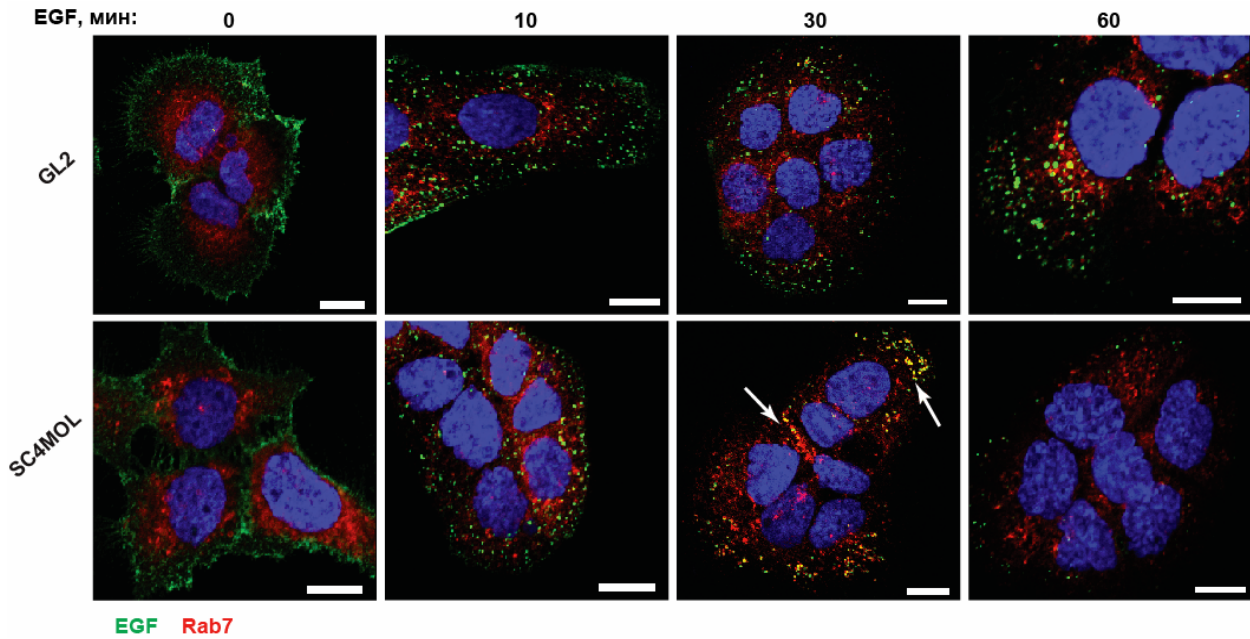


Рис. 12. Количество рецептора ЭФР в поздних эндосомах увеличивается после удаления ферментов SC4MOL и NSDHL посредством миРНК трансфекции. Сверху – иммунофлуоресцентные картинки со стимуляцией клеток A431 меченым зеленым красителем ЭФР (EGF) в течение указанного времени и окраской поздних эндосом (Rab7) красным; стрелками указаны места колокализации. Снизу – процент колокализации зеленого и красного сигналов в образцах. GL2 – контрольная миРНК, \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующим значением в контрольных клетках.

### Дегградация рецептора ЭФР

Для анализа дегградации рецептора ЭФР использовалась клеточная линия SCC61. После активации рецептора лигандом в течение указанного времени клетки лизировались и подвергались иммуноблоттингу (рис. 13).



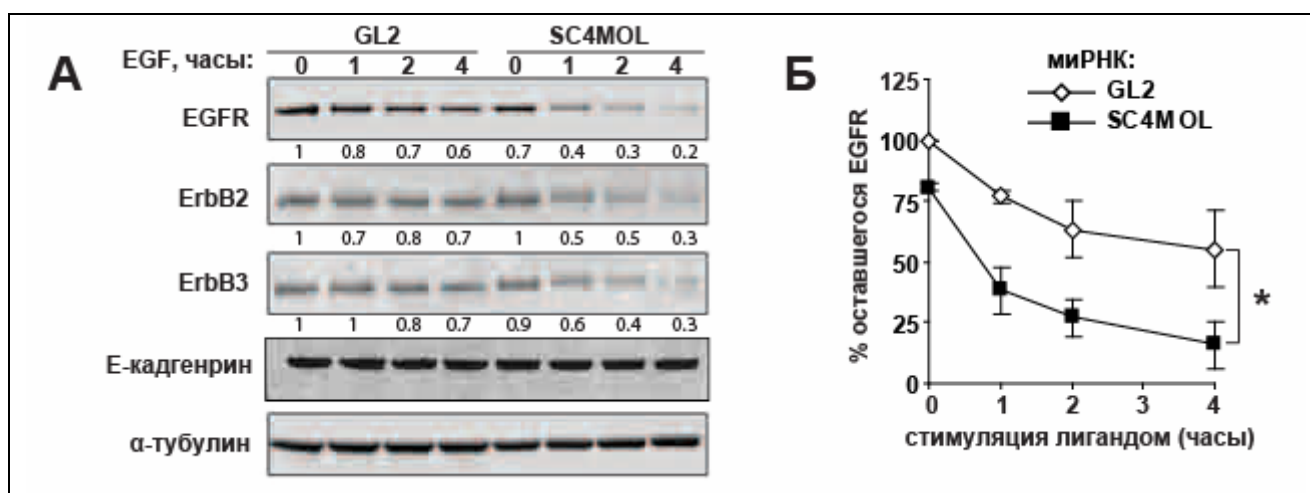
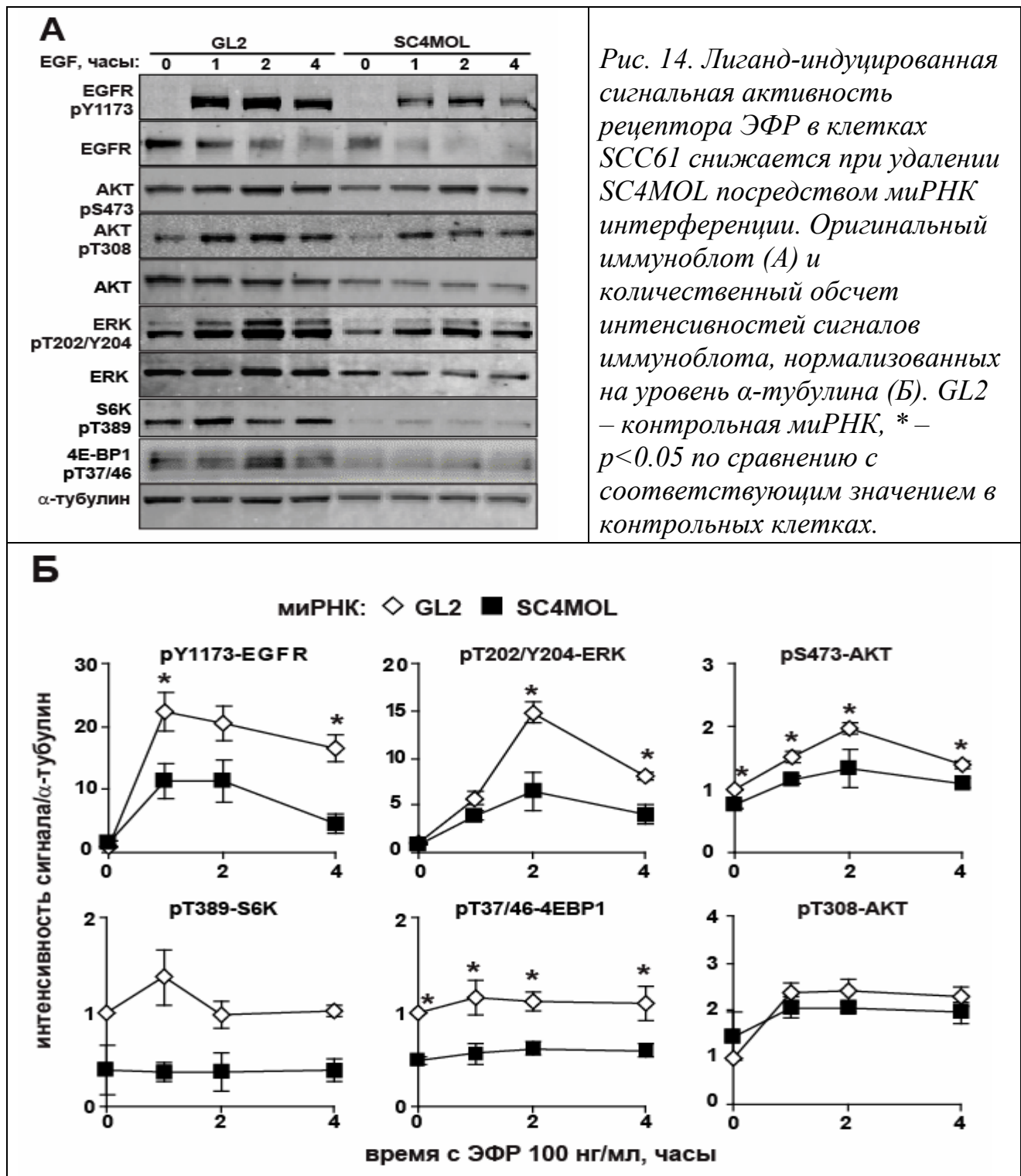


Рис. 13. Ускорение деградации рецептора ЭФР и его корецепторов в клетках с удаленным SC4MOL после стимуляции лигандом в течение указанного времени, измеренная методом иммуноблотинга. Оригинальный тиуноблот с указанными интенсивностями соответствующих сигналов (А) и количественный обсчет иммуноблота, нормализованный на уровень рецептора в контрольных клетках. GL2 – контрольная миРНК, \* –  $p < 0.05$  по сравнению с соответствующим значением в контрольных клетках.

В контрольных клетках при стимуляции лигандом в течение 4 часов наблюдается деградация примерно 50% рецептора по сравнению с исходным уровнем. В клетках с удаленным SC4MOL за такое же время стимуляции деградировало 80% рецептора. Кроме самого рецептора ЭФР ускоренной деградации подвергались его корецепторы ERB2 и ERB3, образующие гетеродимеры с EGFR на поверхности клеток. Уровень другого мембранного белка Е-кадгерина, не взаимодействующего с рецептором ЭФР, при ингибировании SC4MOL не менялся.

### ***Изменение сигнальной активности рецептора ЭФР***

Главными стимуляторами онкогенного процесса являются белки АКТ и MAP-киназа ERK, поэтому для описания сигнальной активности рецептора были выбраны эти две киназы и их нижестоящие эффекторы (рис. 14).

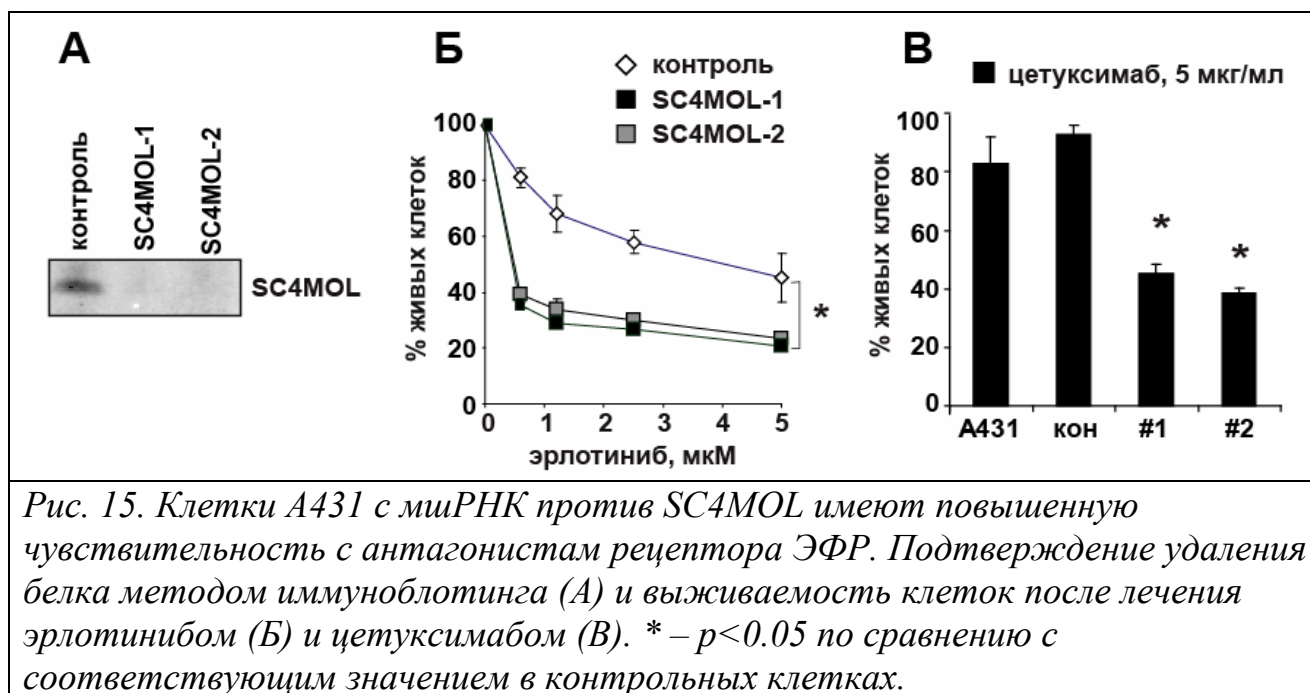


Клетки с удаленной метилоксидазой SC4MOL имели значительно сниженный уровень фосфорилирования как самого рецептора ЭФР, так и его сигнальных эффекторов ERK и АКТ (по остатку серина 473), а также двух киназ из пути mTOR: S6K и 4E-BP1. Это свидетельствует об общем

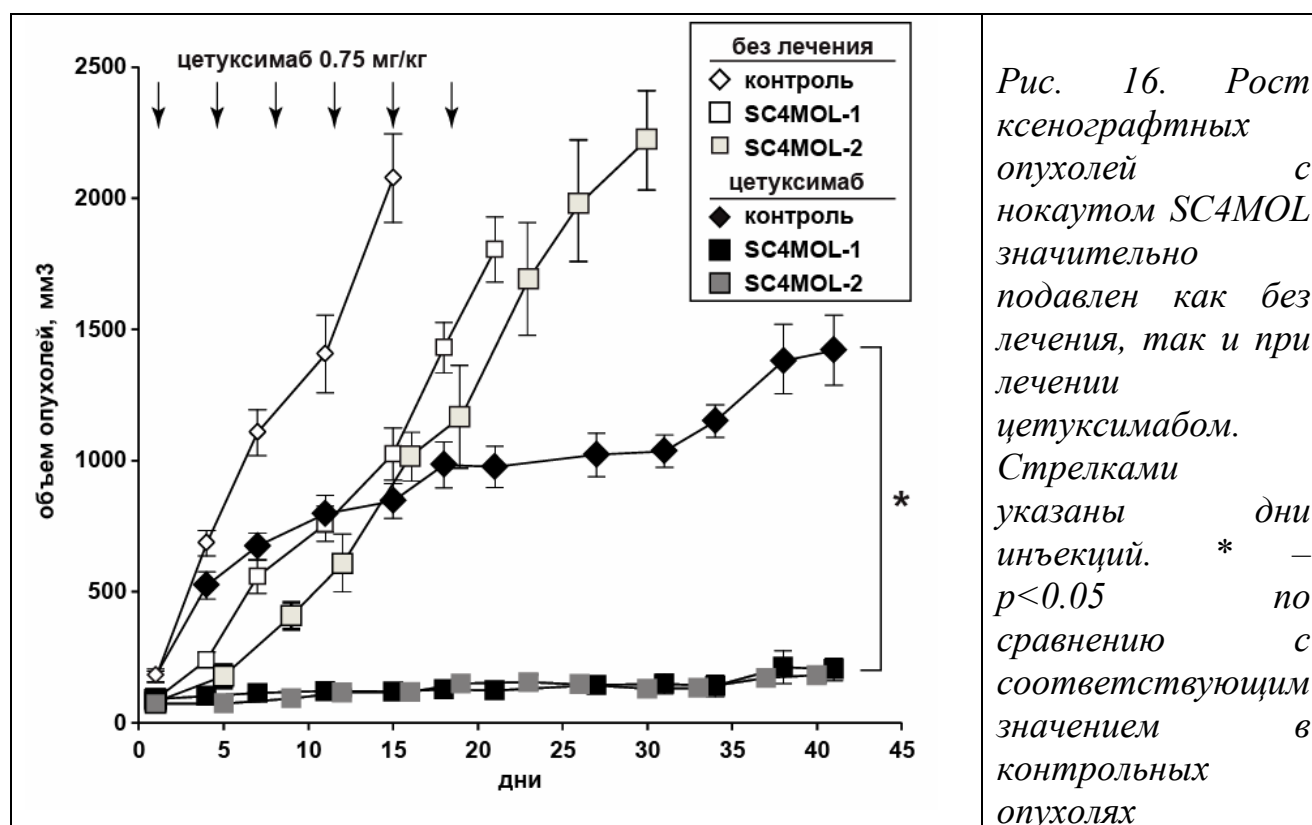
подавлении митогенной активности и снижении биосинтетических процессов.

### ***Влияние на рост ксенографтных опухолей у мышей***

Для использования клеток в экспериментах *in vivo* для начала была получена линия клеток A431 со стабильным нокаутом гена SC4MOL. Для этого была проведена вирусная трансфекция двумя плазмидами, содержащими малую шпилечную РНК (мшРНК) против различных участков мРНК гена SC4MOL. Обе клеточные линии с мшРНК, как и линии после трансфекции миРНК (рис. 1), имели повышенную чувствительность к антагонистам рецептора ЭФР (рис. 15).



После подкожной инъекции данных клеток мышам SCID в течение недели наблюдалось образование опухолей. Мыши были разделены на группы с лечением антителом против рецептора ЭФР цетуксимабом и без лечения. Цетуксимаб вводился внутривентрально два раза в неделю в течение трех недель. Измерения опухолей проводились два раза в неделю. Результаты измерений приведены на рис. 16.



Без лечения контрольные опухоли в течение двух недель достигали больших размеров (более 200 см<sup>3</sup>). Опухоли с нокаутом гена SC4MOL без лечения росли примерно в два раза медленней, но, тем не менее, постоянно увеличивались в объеме. Лечение антителом против рецептора ЭФР цетуксимабом значительно замедляло рост контрольных опухолей, но после окончания лечения их рост увеличивался. При лечении SC4MOL-дефицитных опухолей цетуксимабом опухоли развивались значительно медленней как во время, так и после лечения и после достижения определенного минимального объема переставали расти.

## ВЫВОДЫ

1. Удаление ферментов SC4MOL и NSDHL, катализирующих реакцию С4-деметилирования на дистальном участке пути биосинтеза стеролов, значительно сенситизирует опухолевые линии A431, SCC61, SCC68 и PC9 к воздействию антагонистов рецептора ЭФР эрлотинибу и цетуксимабу. Это данные подтвердились как при проведении

миРНК трансфекции клеток, так и при использовании мшРНК против соответствующих генов.

2. Биоинформативный анализ генетических и физических взаимодействий ортолога гена *SC4MOL* в *Saccharomyces cerevisiae* показал, что 28% всех взаимодействий приходится на гены, регулирующие внутриклеточный везикулярный транспорт.
3. Удаление ферментов *SC4MOL* и *NSDHL* в клеточной линии SCC61 приводит к изменению внутриклеточного транспорта рецептора ЭФР, направляя его преимущественно в сторону деградации. Это уменьшает общий активный пул рецептора, приводя к снижению активности основных онкогенных сигнальных путей.
4. Ксенографтные опухоли с удаленным ферментом *SC4MOL* растут значительно медленней без лечения по сравнению с контрольными клетками и полностью останавливают рост при лечении цетуксимабом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск новых мишеней для лекарственного воздействия является сложной задачей. В данной работе был применен подход с использованием явления синтетической летальности для нахождения способа увеличения эффективности блокаторов рецептора ЭФР. Это привело к описанию гена *SC4MOL*, кодирующего метилоксидазу из пути биосинтеза стеролов, в качестве мишени, блокада которой приводит к существенному увеличению чувствительности опухолевых клеток к ингибитору рецептора ЭФР эрлотинибу.

Было показано, что удаление *SC4MOL* изменяет внутриклеточное движение рецептора ЭФР, направляя его в сторону деградации. Это приводит к снижению активного пула рецептора и, как результат, к

подавлению его сигнальной активности, что для опухолевых клеток оказывается катастрофическим. Такие клетки сначала замедляют рост, а затем начинают погибать механизмом апоптоза, который является самым благоприятным способом гибели нежелательных клеток в организме. Полученные данные позволяют предположить успешное применение ингибирования метилоксидазы SC4MOL на людях.

Таким образом, описанный в данной диссертационной работе способ увеличения эффективности блокаторов рецептора ЭФР может в последующем использоваться в клинической практике для терапии опухолей, ассоциированных с активностью рецептора ЭФР.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Горин, А. О. Блокада биосинтеза холестерина на этапе С4-деметиляции сенситизирует опухолевые клетки к блокаторам рецептора эпидермального фактора роста / А. О. Горин, З. И. Абрамова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. Науки. – 2012. – Т. 154 – кн. 2. – С. 33-41.
2. Gorin, A. Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling / A. Gorin, L. Gabitova, I. Astsaturov // Current Opinion in Pharmacology – 2012. – Vol. 12(6). – P. 710-716.
3. Sukhanova, A. L. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation / A. L. Sukhanova, **A. Gorin**, I. G. Serebriiskii, L. Gabitova, H. Zheng, D. Restifo, B. Egleston, et al. // Cancer Discovery – 2013. – Vol. 3(1). – P. 96-111.
4. Горин, А. О. Блокада внутриклеточного синтеза холестерина на этапе С4-деметиляции ингибирует опухолевый рост in vivo / А. О. Горин, Л. Р. Габитова, З. И. Абрамова // Здоровье человека в XXI

- веке: сб. научных статей. С.С. – Казань: Изд-во Казанского Медицинского Университета – 2012. – С. 452-456.
5. Горин, А. О. Блокада C4-деметиляции пути биосинтеза холестерина сенситизирует опухолевые клетки блокаторам рецептора эпидермального фактора роста / А. О. Горин, З. И. Абрамова // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сб.трудов II Межд. Интернет-конференции. Т.1. – Казань: изд-во Казанский университет. – 2012. – С. 87-89.
  6. Gorin, A. The C4-demethylating genes in the cholesterol pathway regulate epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor response by targeting EGFR to degradation / A. Gorin, A. L. Sukhanova, H. Zheng, T. Bagnyukova, I. G. Serebriiskii, D. Cunningham, L. E. Cratz, L. M. Weiner, R. I. Kelley, G. E. Herman, E. A. Golemis, I. A. Astsaturov // Materials of 50th annual meeting of American Society for Cell Biology. Philadelphia, PA. – 2010. – p.49.
  7. Gorin, A. Targeting cholesterol pathway genes sensitizes cancer cells to EGFR inhibitors / A. Gorin, A. L. Sukhanova, H. Zheng, T. Bagnyukova, I. G. Serebriiskii, D. Cunningham, L. E. Cratz, L. M. Weiner, R. I. Kelley, G. E. Herman, E. A. Golemis, I. A. Astsaturov // Fox Chase Cancer Center 13th Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference. Philadelphia, PA. – 2011. – P. 50.
  8. Gorin, A. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGFR inhibitors via increased EGFR degradation / A. Gorin, A. L. Sukhanova, E. A. Golemis, I. A. Astsaturov, H. Zheng, I. G. Serebriiskii, B. Egleston, D. Cunningham, G. E. Herman, L. E. Cratz, R. I. Kelley, L. M. Weiner // Metabolism and Cancer Conference of American Association for Cancer Research. Baltimore, MD. – 2011. – P. 78.

9. Gorin, A. Targeting cholesterol pathway genes sensitizes cancer cells to EGFR inhibitors / A. Gorin, A. L. Sukhanova, L. Gabitova, H. Zheng, D. Restifo, T. Bagnyukova, I. G. Serebriiskii, D. Cunningham, L. E. Cratz, L. M. Weiner, R. I. Kelley, G. E. Herman, E. A. Golemis, I. A. Astsaturov // Molecular Targets and Cancer Therapeutics International Conference of American Association for Cancer Research. San-Francisco, CA. – 2011.
10. Горин, А. О. Блокада С4-деметиличования пути биосинтеза холестерина сенситизирует опухолевые клетки к блокаторам рецептора ЭФР / А. О. Горин, З. И. Абрамова // III Межд. научно-практ. конференция "Новые концепции механизмов воспаления, аутоиммунного ответа и развития опухоли". Материалы конференции – Казань: ИД "Меддок" – 2012. – С. 34-36.
11. Горин, А. О. Роль биосинтеза стеролов в чувствительности опухолевых клеток к блокаторам рецептора эпидермального фактора роста / А. О. Горин, Л. Р. Габитова, З. И. Абрамова // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сб. трудов III Межд. Интернет-конференции. Т. I. – Казань: изд-во Казанский университет. – 2013. – С. 102.

420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ к.104, отдел аттестации научных кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru